

PCT/JP03/15010

25.11.03

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

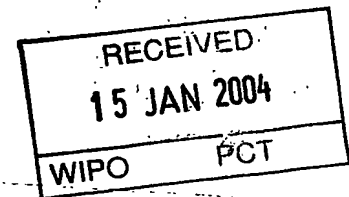
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年11月25日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-340464  
[ST. 10/C]: [JP2002-340464]

出 願 人  
Applicant(s): 日清紡績株式会社

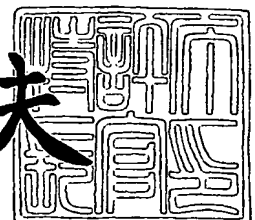


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年12月25日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3107210

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-B0369

【提出日】 平成14年11月25日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68

【発明の名称】 生体分子の金属担体への固定法

【請求項の数】 6

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市緑区大野台 1 - 2 - 3 日清紡績株式会社  
研究開発センター内

【氏名】 木村 直紀

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市緑区大野台 1 - 2 - 3 日清紡績株式会社  
研究開発センター内

【氏名】 小田 竜一

【特許出願人】

【識別番号】 000004374

【氏名又は名称】 日清紡績株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 0 3 - 3 6 6 9 - 6 5 7 1

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 生体分子の金属担体への固定法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 生体分子を担体に固定化する方法であって、生体分子の溶液を担体上にスポットする工程と、前記生体分子溶液をスポットした担体に波長 280 nm の成分を含む紫外線を照射する工程を含み、前記担体は金属であることを特徴とする方法。

【請求項 2】 前記金属は、周期律表第 2 周期～第 7 周期の I、II、III、IV、V、VI、VII 族および遷移元素から選ばれる金属、又は同金属を含む合金である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 前記紫外線の照射量は  $100 \text{ mJ} / \text{cm}^2$  以上である請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】 前記生体分子は核酸、タンパク質、糖、抗原、抗体、ペプチド、酵素から選ばれる請求項 1～3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】 生体分子が担体上に固定化された生体分子固定化担体の製造法であって、生体分子の溶液を担体上にスポットする工程と、前記生体分子溶液をスポットした担体に波長 280 nm の成分を含む紫外線を照射し、前記生体分子を担体に固定化する工程を含む方法。

【請求項 6】 前記生体分子は核酸であって、核酸固定化担体はハイブリダイゼーションによる核酸の分析に用いられるものである請求項 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、核酸等の生体分子を担体に固定化する方法に関する。本発明の方法は、ハイブリダイゼーションによる核酸の分析等の操作に有用である。

【0002】

【従来の技術】

従来、ハイブリダイゼーションによる核酸の分析や、免疫アッセイ等においては、核酸やタンパク質を膜や平板などの担体に固定化する技術が利用されてい

る。このような生体分子の固定化法として、核酸では、以下のものが知られている。

【0003】

(1) 5' 末端にチオール基を有する核酸とチオール基を含むビーズ状基材間のジスルフィド結合による固定（非特許文献1）等のような、修飾基を導入した核酸を化学結合させる方法。

【0004】

(2) 核酸を、紫外線 (UV) 照射又は加熱処理により、ニトロセルロース、ナイロンメンブレン、又はポリ-L-リジン等のカチオンポリマーで被覆されたガラス等の担体等に、吸着固定させる方法（非特許文献2、特許文献1）。

【0005】

(3) ポリリジン溶液で処理されたマイクロプレートのウェル中に核酸を注入し、37℃に加熱することにより、物理吸着させることにより固定する方法（非特許文献3）。

【0006】

(4) 基材上に結合させたヌクレオチドを用い、基材上でDNAを合成する方法（特許文献2）。

【0007】

(5) カルボジイミド基を有する高分子化合物を担持させたガラス等の基材に核酸を固定する方法（特許文献3）。

【0008】

しかし、上記の(1)の方法は、極めて特殊な機械と試薬を必要とする。また、(2)及び(3)の方法においては、ハイブリダイゼーションを行った場合、特に操作過程で担体から核酸が剥がれ落ち、結果として検出感度が下がったり、再現性が得られない等の欠点がある。また、この方法では、長い核酸は固定できるが、オリゴマー等約50mer以下の短い核酸になると、効率よく固定化できないという欠点がある。尚、これらの方法では、UV照射量は数十mJ/cm<sup>2</sup>程度である。さらに、(4)の方法は、基材上でDNAを合成するために、極めて特殊な機械と試薬を必要とし、さらに、合成できる核酸も25mer程度までに限られると

いう欠点がある。また、(5)の方法は、基材の材料が限られ、表面のコーティング工程が必要である。

【0009】

【特許文献1】

特表平10-503841号公報

【特許文献2】

国際公開第97/10365号パンフレット (W097/10365)

【特許文献3】

特開平8-23975号公報

【非特許文献1】

P.J.R.Day, P.S.Floria, J.E.Fox, M.R.Walker, Biochem.J., 278, 735-740(1991)

【非特許文献2】

J.Sambrook, E.F.Fritsch and T.Manias, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Second Edition, pages 2.109-2.113 and pages 9.34-9.46

【非特許文献3】

G.C.N.Parry and A.D.B.Malcom, Biochem. Soc.Trans., 17, 230-231(1989)

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記従来技術の状況に鑑み、生体分子、例えば核酸、特に短鎖長の核酸を担体に、簡便、かつ、効率よく固定する方法を提供することを課題とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、核酸溶液を金属製の担体上にスポットした後に、紫外線を担体に照射することによって、核酸を担体に効率よく固定化することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、以下のとおりである。

【0012】

(1) 生体分子を担体に固定化する方法であって、生体分子の溶液を担体上にスポットする工程と、前記生体分子溶液をスポットした担体に波長 280 nm の成分を含む紫外線を照射する工程を含み、前記担体は金属製であることを特徴とする方法。

(2) 前記金属は、周期律表第 2 周期～第 7 周期の I、II、III、IV、V、VI、VII 族および遷移元素から選ばれる金属、又は同金属を含む合金である (1) に記載の方法。

(3) 前記紫外線の照射量は  $100 \text{ mJ} / \text{cm}^2$  以上である (1) 又は (2) に記載の方法。

(4) 前記生体分子は核酸、タンパク質、糖、抗原、抗体、ペプチド、酵素から選ばれる (1) ～(3) のいずれかに記載の方法。

(5) 生体分子が担体上に固定化された生体分子固定化担体の製造法であって、生体分子の溶液を担体上にスポットする工程と、前記生体分子溶液をスポットした担体に波長 280 nm の成分を含む紫外線を照射し、前記生体分子を担体に固定化する工程を含む方法。

(6) 前記生体分子は核酸であって、核酸固定化担体はハイブリダイゼーションによる核酸の分析に用いられるものである (5) に記載の方法。

【0013】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に用いる担体は、生体分子を固定化するためのものであり、金属製であることを特徴とする。金属としては、紫外線照射により生体分子を固定化することができるものであれば特に制限されず、好ましくは、周期律表第 2 周期～第 7 周期の I、II、III、IV、V、VI、VII 族および遷移元素から選ばれる金属、又は同金属を含む合金が挙げられる。

【0014】

上記周期律表第 2 周期～第 7 周期の I、II、III、IV、V、VI、VII 族および遷移

元素から選ばれる金属として特に好ましいものとしては、アルミニウム、チタン、白金、タングステン、モリブデン等が挙げられる。

#### 【0015】

また、上記合金として具体的には、洋白（成分：Cu, Ni, Zn）、真鍮（成分：Cu, Zn）、ブロンズ（成分：Cu, Be）、モネル（成分：Cu, Ni, Fe, Mn）、ニッケルコバルト合金（成分：Ni, Co）、ニッケルクロム合金（成分：Ni, Cr）、コバルト合金（成分：Co, Ni, Cr）、ステンレス（成分：Ni, Cr, Fe）、bチタン（成分：Ti, V, Al）、abチタン（成分：Ti, V, Al）、NT合金（成分：Ti, Ni）、アルミニウム合金（成分：Al, Cu, Mg, Si, Mn, Zn）、ジュラルミン（成分：Al, Cu, Si, Fe, Mn, Mg, Zn）、マグネシウム合金（成分：Mg, Al, Zn）、K24（成分：Au）、K18（成分：Au, Ag, Cu）、ベリリウム銅（成分：Cu, Be）、鋳鉄（成分：Fe, Mn, S, C）、炭素鋼（成分：Fe, C, Si, Mn, P, S）、青銅鋳物（成分：Cu, Sn, Zn, Pb）、りん青銅鋳物（成分：Cu, Zn, P）、黄銅鋳物（成分：Cu, Zn, Pb）、マンガン黄銅（成分：Cu, Zn, Mn, Fe, Al）、シルジン青銅鋳物（成分：Cu, Si, Zn）、アルミニウム青銅鋳物（成分：Cu, Al, Fe, Ni, Mn）、エリンバー（成分：Ni, Cr, Mn）、エリンバーエクストラ（成分：Ni, Cr, Co, Mn）、インバー（成分：Ni, Fe）、スーパーインバー（成分：Fe, Ni, Co）、ステンレスインバー（成分：Fe, Co, Cr）、Malottes（成分：Sn, Bi, Pb）、リポウィッツ（Lipowitz）（成分：Sn, Bi, Pb, Cd）、ウッズ（Wood's）（成分：Sn, Bi, Pb, Cd）、マンガニン（成分：Cu, Mn, Ni, Fe）、イザベリン（成分：Cu, Mn, Al）、コンスタント（成分：Cu, Ni）、アルクレス（成分：Fe, Cr, Al）、カントル（成分：Cr, Fe, Al, Co）、アルメル（成分：Ni, Al）、磁性材料（Fe, Ni, Co等強磁性遷移元素を含む材料）、パーマロイ（成分：Fe, Ni）、アルパーム（成分：Fe, Al）、フェライト（ $\text{Fe}_2\text{O}_3$ を主成分とする複合酸化物）、センダスト（成分：Fe, Si, Al）、スーパーセンダスト（成分：Fe, Si, Al, Ni）、アルニコ（成分：Fe, Al, Ni, Co）、水素吸蔵金属（ランタンニッケル合金（成分：La, Ni）等）、Co-Cr系合金、 $\text{SnO}_2$ 系酸化物、Nb-Ti合金、制振合金（振動を低減もしくは吸収、振動の伝播を遮断する合金材料、Al-Zn超塑性合金、サイレントアロイ、ニチノール等）、電極用材料、半導体材料（シリコン、ゲル



マニウム、カリウムヒ素等)等が挙げられる。

【0016】

また、上記金属は、他の金属でメッキ処理(加工)されていても良い。更に、前記金属は、形状を保持するために異なる種類の前記金属が積層してもよく、単一金属であっても良い。

【0017】

本発明における担体は、本質的に上記金属からなる。担体は、金属のみから構成されていてもよいし、非金属材料上に金属が接着又はメッキ等により積層されていてもよい。

【0018】

上記担体の形状は、特に問われないが、箔(フォイル)状、平板(プレート)状、薄片(ウェーハ)状、フィルター状、ビーズ状等が挙げられる。また、マイクロタイタープレートのような形状であっても良い。さらに、得られる結果の保存を容易にするため、平板等の裏面をシール等に使用できる材料(接着剤等)を塗布、コート等を行うことによって、シールとしても使用することもできる。

【0019】

上記担体の所定の位置に、生体分子の溶液をスポットする。生体分子としては、核酸、タンパク質、糖、抗原、抗体、ペプチド、酵素などが挙げられる。以下、生体分子として核酸を例として説明するが、固定の際に紫外線を照射する以外は、他の物質でも通常固定化に用いられている方法や条件を採用することができる。

核酸としては、通常の固相化核酸を用いた核酸同士のハイブリダイゼーションに用いられる固相化核酸と特に変わるところはなく、ハイブリダイゼーションが可能な核酸であれば特に制限されず、例えば、天然又は合成のDNA(オリゴヌクレオチドを含む)もしくはRNA(オリゴヌクレオチドを含む)が挙げられる。また、上記核酸は1本鎖であっても、2本鎖であっても構わない。核酸の鎖長は、ハイブリダイゼーションが可能な長さであれば特に制限されないが、通常5～5000塩基、好ましくは20～10000塩基である。また、核酸の5'末端あるいは3'末端にチミジン等、紫外線によって反応活性基を有するオリゴ

ヌクレオチドの重合体を有しても良い。

#### 【0020】

核酸を溶解する溶媒も特に制限されず、蒸留水、又は通常核酸溶液の調製に用いられる緩衝液、例えばTE緩衝液(10mM Tris塩酸, pH8.0/1mM EDTA)等のTris緩衝液、食塩を含む水溶液、カルボン酸塩を含む水溶液(クエン酸ナトリウム、クエン酸アンモニウム、酢酸ナトリウム等)、スルホン酸塩を含む水溶液(ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸アンモニウム等)、ホスホン酸塩を含む水溶液等(リン酸ナトリウム、リン酸アンモニウム等)等を挙げることができる。また、一般に市販されている溶媒、Micro Spotting Solution (TeleChem International, Inc.社製)等も挙げることができる。また、核酸溶液の濃度も特に制限されないが、通常1mmol/ml~1fmol/ml、好ましくは100pmol/ml~100fmol/mlの濃度である。

#### 【0021】

核酸溶液を担体上にスポットする方法としては、ピペットで核酸溶液を担体上に滴下する方法、又は市販のスポッタを用いる方法等が挙げられる。スポットの形状及びスポット量としては、核酸溶液をスポットした位置を把握することができる程度であれば、特に制限されないが、形状としては点状又は円状が好ましい。また、好ましいスポット量は10nl~10mlである。核酸溶液は、担体上に1箇所又は複数箇所にスポットされる。スポットされる核酸溶液は、1種類でも2種類又はそれ以上であってもよい。尚、担体に核酸が固定されたことを示す陽性コントロールとして、標識した核酸を固定化しておいてもよい。

#### 【0022】

本発明の好ましい形態においては、核酸溶液を担体上にスポットした後に、280nmの波長を含む紫外線を照射する。また、前記核酸溶液をスポット後紫外線照射前に乾燥させることができる。前記核酸溶液の乾燥方法としては、自然に乾燥させてもよく、加熱して乾燥させてもよい。加熱する場合の温度は、通常30~100℃、好ましくは35~45℃である。

#### 【0023】

次に、担体、少なくとも担体の核酸を固定した部位に、波長280nmの成分を含

む紫外線を照射する。具体的には、波長280nmの単色光でもよいし、波長280nmを含むブロードな波形を有する紫外線であっても良い。照射量は、累積照射量として通常100mJ/cm<sup>2</sup>以上、好ましくは200mJ/cm<sup>2</sup>以上である。

#### 【0024】

上記のようにして、核酸を担体上に固定化することにより、核酸固定化担体が製造される。本発明の方法により得られる核酸固定化担体は、例えば、ハイブリダイゼーションによる核酸の分析に用いることができる。本発明の方法により担体に固定化された核酸は、通常のハイブリダイゼーションの条件下で担体から脱離しにくい、紫外線照射を行わない場合に比べて検出感度が良好で、再現性も良い。ハイブリダイゼーション及びその検出は、通常の固相化核酸を用いたハイブリダイゼーションと同様にして行うことができる。

#### 【0025】

本発明では、核酸を固定化するのに用いる担体として、安価な金属材料を用いることができるので、低コスト化が可能である。また、金属材料は形成が容易なため、様々な形態のDNAマイクロアレイの作製が容易となる。また、長期保存が可能であり、保存安定性に優れている。さらに、本発明の方法は、担体表面のコーティング工程が不要であり、電極等に使用される金属に直接核酸を固定することができる。電極に核酸を固定することにより溶液中の相補的な核酸と固定された核酸とを効率良くハイブリダイゼーションを行うことができる。核酸は負電化をもっている為、正極に引き寄せられるため、正極の付近は核酸濃度が高くなりやすく、ハイブリダイゼーションが効率よく進むと考えられる。

#### 【0026】

##### 【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

#### 【0027】

##### 【実施例1】核酸の平板への固定化

常法に従い、オリゴヌクレオチド合成機 (Perkin-elmer Applied biosystems) を用いて、配列番号1、2に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド (21mer) を合成した。また、プローブとして、配列番号3に示す塩基配列を有するD

NA (262bp) を調製した。尚、配列番号 1 に示すオリゴヌクレオチド及びプローブは、5' 末端をビオチン化した。また、配列番号 2 に示すオリゴヌクレオチドはビオチン化プローブと相補性を持っている。これらのオリゴヌクレオチドを  $1\text{pmol}/\mu\text{l}$  になるように  $1\times\text{TE}$  緩衝液 (10mM Tris塩酸, pH 8/1mM EDTA) に溶解した。

#### 【0028】

市販品のアルミニウム箔 (三菱アルミニウム株式会社製) の所定の位置に、上記オリゴヌクレオチド溶液それぞれを、3箇所ずつスポットした (図1)。スポットの量は  $0.5\mu\text{l}$  ずつであり、スポットの大きさは直径約 1mm であった。このアルミニウム箔を乾燥機に入れ、 $37^{\circ}\text{C}$  で 20 分乾燥した。次に Uvstratalinker 2400 (STRATAGENE 社製) を用い、波長 280nm を含む紫外線を 16cm の距離から  $250\text{mJ}/\text{cm}^2$  照射した。照射時間は 100 秒であった。その後、前記アルミニウム箔を水中で 30 分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

#### 【0029】

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液 ( $1\times\text{TE}$  緩衝液) も同様にアルミニウム箔にスポットし、固定化の操作を行った。

#### 【0030】

##### 【比較例 1】

予め、アルミニウム箔に、Uvstratalinker 2400 (STRATAGENE 社製) を用い、波長 280nm を含む nm の紫外線を 16cm の距離から  $250\text{mJ}/\text{cm}^2$  照射した。実施例 1 に記載のオリゴヌクレオチド溶液それぞれを、アルミニウム箔の所定の位置に、3箇所ずつスポットした。スポットの量は  $0.5\mu\text{l}$  ずつであり、スポットの大きさは直径約 1mm であった。照射時間は 100 秒であった。このアルミニウム箔を乾燥機に入れ  $37^{\circ}\text{C}$  で 20 分乾燥した。その後、前記アルミニウム箔を水中で 30 分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

#### 【0031】

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液 ( $1\times\text{TE}$  緩衝液) も同様にアルミニウム箔にスポットし、固定化の操作を行った。

#### 【0032】

**【実施例 2】 ハイブリダイゼーション及びその検出****(1) ハイブリダイゼーション**

実施例 1 及び比較例 1 のオリゴヌクレオチド固定化アルミニウム箔の核酸を固定化した部分に、3pmol ビオチン化プローブ (262bp) を含むハイブリダイゼーション溶液 (Arrayit UniHyb (TeleChem International, Inc.)) 60  $\mu$ l をのせ、アルミニウム箔を水が浸入しないケース (ハイブリカセット) に入れてそのケースごとウォーターバスに沈め、45℃で 2 時間加熱した。

**【0033】****(2) ポストハイブリダイゼーション**

上記ハイブリダイゼーションの後、以下の条件でポストハイブリダイゼーション洗浄を行い、オリゴヌクレオチド固定化アルミニウム箔に非特異的に吸着したプローブを除去した。

**【0034】**

[ポストハイブリダイゼーション洗浄の条件]

- 1) 2×SSC, 0.1%SDS; 室温、5 分間、2 回
- 2) 0.2×SSC, 0.1%SDS; 40℃、5 分間、2 回
- 3) 2×SSC; 室温 1 分間、3 回

**【0035】****(3) アルミニウム箔に固定化されたオリゴヌクレオチド及びハイブリダイゼーションの検出**

アルミニウム箔のハイブリダイゼーション溶液を載せた部分に、乳タンパクを含むブロッキング溶液 (ブロックエース 雪印乳業製) 1.5ml をのせ、室温で 30 分間ブロッキングを行った。ブロッキング溶液を除いた後、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼコンジュゲート溶液 (VECTOR 社製) を 1.5ml のせ、室温で 30 分間反応させた。つぎに、アルミニウム箔を TBST (50mM Tris-HCl (pH7.5), 0.15M NaCl, 0.05% Tween 20) 溶液に浸し、5 分間振とうして反応しなかったコンジュゲートを除去した。最後に、アルミニウム箔のハイブリダイゼーション溶液を載せた部分に基質溶液 (TMB) を 1.5ml のせて、30 分間放置し、発色反応を行った。

## 【0036】

その結果を、次に示す比較例1の結果とともに、表1に示す。表1中の記号の意味は、表2以下でも同様である。配列番号1のオリゴヌクレオチドを固定化した位置のシグナルは固定化されたオリゴヌクレオチドの量を、配列番号2のオリゴヌクレオチドを固定化した位置のシグナルはハイブリダイゼーションの強度を、それぞれ示す。

## 【0037】

## 【表1】

表1

固定化したオリゴヌクレオチド		
	配列番号1	配列番号2
実施例1	◎	◎
比較例1	×	×

◎：大部分のシグナルが非常に高感度かつ非常に明瞭に現れた。

○：大部分のシグナルが高感度かつ明瞭に現れた。

△：一部のシグナルが低感度または不明瞭に現れた。

×：大部分のシグナルが低感度または不明瞭に現れた。またはシグナルが全く現れなかった。

## 【0038】

表1の結果から明らかなように、実施例1のオリゴヌクレオチド固定化アルミニウム箔は、比較例1のオリゴヌクレオチド固定化アルミニウム箔に比べて、オリゴヌクレオチドが確実にアルミニウム箔上に固定化されていることがわかる。また、実施例1のオリゴヌクレオチド固定化アルミニウム箔では、ハイブリダイゼーションシグナルも明瞭に現れた。なお、コントロールの位置（核酸を含まない溶液をスポットした箇所）にはシグナルはまったく現れなかった。

## 【0039】

## 【実施例3】核酸の平板への固定化

常法に従い、オリゴヌクレオチド合成機 (Perkin-elmer Applied biosystems) を用いて、配列番号4、5及び6に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド (31mer) を合成した。尚、配列番号4に示すオリゴヌクレオチドは、5'末端をビオチン化した。また、配列番号4及び5に示すオリゴヌクレオチドは、実施例1に記載の配列番号1及び2に示すオリゴヌクレオチドの5'末端に10個のチミジンが連結した配列を有している。配列番号5のオリゴヌクレオチドは、前記ビオチン化プローブと相補性を持っており、配列番号6に示すオリゴヌクレオチドは、配列番号5に示すオリゴヌクレオチドと1塩基配列が異なるため相補性を持っていない。これらのオリゴヌクレオチドを100pmol/mlになるように5×SSCに溶解した。

## 【0040】

市販品のステンレス製の平板 (特殊金属工業株式会社製) の所定の位置に、上記オリゴヌクレオチド溶液それぞれを、スポットター (Pyxis5500 CARTESIAN社製) を用いて3箇所ずつスポットした。スポットの大きさは直径約0.3mmであった。この平板を乾燥機に入れ、42℃で20分乾燥した。次にUvstratalinker 2400 (STRATAGENE社製) を用い、波長280nmを含む紫外線を16cmの距離から300mJ/cm<sup>2</sup>照射した。照射時間は120秒であった。その後、前記平板を水中で30分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

## 【0041】

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液 (2×SSC緩衝液) も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

## 【0042】

## 【比較例2】

予め、ステンレス製の平板に、Uvstratalinker 2400 (STRATAGENE社製) を用い、波長280nmを含む紫外線を16cmの距離から300mJ/cm<sup>2</sup>照射した。実施例3に記載のオリゴヌクレオチド溶液それぞれを、ステンレス製の平板の所定の位置に、スポットター (Pyxis5500 CARTESIAN社製) を用いて3箇所ずつスポットした。

照射時間は120秒であった。この平板を乾燥機に入れ42℃で20分乾燥した。その後、前記平板を水中で30分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

#### 【0043】

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液(2xSSC緩衝液)も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

#### 【0044】

##### 【実施例4】ハイブリダイゼーション及びその検出

実施例3及び比較例2のオリゴヌクレオチド固定化平板の核酸を固定化した部分に、3pmolビオチン化プローブ(262bp)を含むハイブリダイゼーション溶液(Arrayit UniHyb (TeleChem International, Inc.) 60mlをのせ、平板を水が浸入しないケース(ハイブリカセット)に入れてそのケースごとウォーターバスに沈め、45℃で2時間加熱した。

#### 【0045】

以下、実施例2と同様にしてポストハイブリダイゼーション、及び平板に固定化されたオリゴヌクレオチドならびにハイブリダイゼーションの検出を行った。その結果を、次に示す比較例2の結果とともに、表2に示す。配列番号4のオリゴヌクレオチドを固定化した位置のシグナルは固定化されたオリゴヌクレオチドの量を、配列番号5のオリゴヌクレオチドを固定化した位置のシグナルはハイブリダイゼーションの強度を、それぞれ示す。

#### 【0046】

#### 【表2】

表2

固定化したオリゴヌクレオチド			
	配列番号4	配列番号5	配列番号6
実施例3	◎	◎	×
比較例2	×	×	×



## 【0047】

表2の結果から明らかなように、実施例3のオリゴヌクレオチド固定化平板は、比較例2のオリゴヌクレオチド固定化平板に比べて、オリゴヌクレオチドが確実に平板上に固定化されていることがわかる。また、実施例3のオリゴヌクレオチド固定化平板では、ハイブリダイゼーションシグナルも明瞭に現れた。ここで、コントロールの位置（核酸を含まない溶液をスポットした箇所）及び配列番号6にはシグナルはまったく現れなかった。

## 【0048】

## 【実施例5】核酸の平板への固定化

銀タンゲステン製の平板（イースタン技研株式会社製）の所定の位置に、実施例3で調製したオリゴヌクレオチド溶液それぞれを、スポッターを用いて3箇所づつスポットした。スポットの大きさは直径約0.3mmであった。この平板を乾燥機に入れ、42℃で20分乾燥した。次にUvstratalinker 2400（STRATAGENE社製）を用い、波長280nmを含む紫外線を16cmの距離から400mJ/cm<sup>2</sup>照射した。照射時間は160秒であった。その後、前記平板を水中で30分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

## 【0049】

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液（2xSSC緩衝液）も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

## 【0050】

## 【比較例3】

予め、銀タンゲステン製の平板に、Uvstratalinker 2400（STRATAGENE社製）を用い、波長280nmを含む紫外線を16cmの距離から400mJ/cm<sup>2</sup>照射した。実施例3に記載のオリゴヌクレオチド溶液それぞれを、銀タンゲステン製の平板の所定の位置に、スポッター（Pyxis5500 CARTESIAN社製）を用いて3箇所づつスポットした。照射時間は160秒であった。この平板を乾燥機に入れ42℃で20分乾燥した。その後、前記平板を水中で30分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

## 【0051】

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液 (2xSSC緩衝液) も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

#### 【0052】

##### 【実施例6】 ハイブリダイゼーション及びその検出

実施例5及び比較例3のオリゴヌクレオチド固定化平板の核酸を固定化した部分に、3pmolビオチン化プローブ (262bp) を含むハイブリダイゼーション溶液 (Arrayit UniHyb (TeleChem International, Inc.) 60mlをのせ、平板を水が浸入しないケース (ハイブリカセット) に入れてそのケースごとウォーターバスに沈め、45℃で2時間加熱した。

#### 【0053】

以下、実施例2と同様にしてポストハイブリダイゼーション、及び平板に固定化されたオリゴヌクレオチドならびにハイブリダイゼーションの検出を行った。その結果を、次に示す比較例3の結果とともに、表3に示す。

#### 【0054】

##### 【表3】

表3

固定化したオリゴヌクレオチド			
	配列番号4	配列番号5	配列番号6
実施例5	◎	◎	×
比較例3	×	×	×

#### 【0055】

表3の結果から明らかなように、実施例5のオリゴヌクレオチド固定化平板は、比較例3のオリゴヌクレオチド固定化平板に比べて、オリゴヌクレオチドが確実に平板上に固定化されていることがわかる。また、実施例5のオリゴヌクレオチド固定化平板では、ハイブリダイゼーションシグナルも明瞭に現れた。ここで

、コントロールの位置（核酸を含まない溶液をスポットした箇所）及び配列番号 6 にはシグナルはまったく現れなかった。

#### 【0056】

##### 【実施例 7】核酸の平板への固定化

常法に従い、配列番号 7 及び 8 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして、 $\lambda$  DNA 断片 (A) を増幅した。得られた断片をアガロース電気泳動し、エチジウムブロマイド染色により検出した結果、その断片の長さは約 300 b であった。また、前記  $\lambda$  DNA と相補的でない  $\lambda$  DNA 断片 (B) (約 300 b) も同様に増幅した。

#### 【0057】

市販品のアルミニウム箔（三菱アルミニウム株式会社製）の所定の位置に、上記  $\lambda$  DNA 溶液それぞれを、スポットター (Pyxis5500 CARTESIAN社製) を用いて 3 箇所ずつスポットした。スポットの大きさは直径約 0.3mm であった。このアルミニウム箔を乾燥機に入れ、42℃で 20 分乾燥した。次に Uvstratalinker 2400 (STRATAGENE社製) を用い、波長 280nm を含む紫外線を 16cm の距離から 600mJ/cm<sup>2</sup> 照射した。照射時間は 240 秒であった。その後、前記アルミニウム箔を水中で 30 分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

#### 【0058】

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液 (1×TE 緩衝液) も同様にアルミニウム箔にスポットし、固定化の操作を行った。

#### 【0059】

##### 【比較例 4】

実施例 7 に記載の  $\lambda$  DNA 溶液 (濃度 1pmol/ul) それぞれを、アルミニウム箔の所定の位置に、スポットター (Pyxis5500 CARTESIAN社製) を用いて 3 箇所ずつスポットした。このアルミニウム箔を乾燥機に入れ 42℃で 20 分乾燥した。その後、前記アルミニウム箔を水中で 30 分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

#### 【0060】

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液 (1×TE 緩衝液) も同様にアルミニウム箔にスポットし、固定化の操作を行った。

## 【0061】

## 【実施例 8】 ハイブリダイゼーション及びその検出

## (1) ハイブリダイゼーション

配列番号 7 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの 5' 末端にビオチンを標識したオリゴヌクレオチド及び配列番号 8 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして、 $\lambda$  DNA 断片 (C) を増幅した。この  $\lambda$  DNA 断片 (C) の配列は、実施例 7 で作製した  $\lambda$  DNA 断片 (A) の配列と同一である。

実施例 7 及び比較例 4 の  $\lambda$  DNA 固定化アルミニウム箔を 95℃ に暖めた水中に 5 分間浸し、4℃ に冷やした水中に 5 分間浸した。次いで、 $\lambda$  DNA 固定化アルミニウム箔の核酸を固定化した部分に、前記 0.5pmol ビオチン化  $\lambda$  DNA (C) を含むハイブリダイゼーション溶液 (Arrayit UniHyb (TeleChem International, Inc.)) 60ml をのせ、アルミニウム箔を水が浸入しないケース (ハイブリカセット) に入れてそのケースごとウォーターバスに沈め、55℃ で 2 時間加熱した。

## 【0062】

## (2) ポストハイブリダイゼーション

上記ハイブリダイゼーションの後、以下の条件でポストハイブリダイゼーション洗浄を行い、 $\lambda$  DNA 固定化アルミニウム箔に非特異的に吸着したプローブを除去した。

## 【0063】

[ポストハイブリダイゼーション洗浄の条件]

- 1) 2×SSC, 0.1%SDS; 室温、5 分間、2 回
- 2) 0.2×SSC, 0.1%SDS; 40℃、5 分間、2 回
- 3) 2×SSC; 室温 1 分間、3 回

## 【0064】

## (3) ハイブリダイゼーションの検出

アルミニウム箔のハイブリダイゼーション溶液を載せた部分に、乳タンパクを含むブロッキング溶液 (ブロックエース 雪印乳業製) 1.5ml をのせ、室温で 30 分間ブロッキングを行った。ブロッキング溶液を除いた後、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼコンジュゲート溶液 (VECTOR 社製) を 1.5ml のせ、

室温で30分間反応させた。つぎに、アルミニウム箔をTBST (50mM Tris-HCl (pH7.5), 0.15M NaCl, 0.05% Tween 20) 溶液に浸し、5分間振とうして反応しなかったコンジュゲートを除去した。最後に、アルミニウム箔 (はく) のハイブリダイゼーション溶液を載せた部分に基質溶液 (TMB) を1.5mlのせて、30分間放置し、発色反応を行った。

【0065】

その結果を表4に示す。

【0066】

【表4】

表4

固定化した核酸		
	λ DNA断片 (A)	λ DNA断片 (B)
実施例7	◎	×
比較例4	×	×

【0067】

表4の結果から明らかなように、ハイブリダイゼーションシグナルが特異的かつ明瞭に現れたことから、実施例7のλ DNA断片固定化アルミニウムはくはλ DNA断片が確実にアルミニウムはく上に固定化されていることがわかる。一方、比較例4のλ DNA断片固定化アルミニウムはくには、シグナルはまったく現れなかった。さらに、実施例7のλ DNA断片固定化アルミニウムはく及び比較例4のλ DNA断片固定化アルミニウムはくのコントロールの位置 (核酸を含まない溶液をスポットした箇所) にもシグナルはまったく現れなかった。

【0068】

【実施例9】核酸の平板への固定化

市販品のステンレス製の平板 (特殊金属工業株式会社製) の所定の位置に、実

実施例 7 に記載の  $\lambda$  DNA 溶液それぞれを、スポッター (Pyxis5500 CARTESIAN 社製) を用いて 3 箇所ずつスポットした。スポットの大きさは直径約 0.3mm であった。この平板を乾燥機に入れ、42℃で 20 分乾燥した。次に Uvstratalinker 2400 (STRATAGENE 社製) を用い、波長 280nm を含む紫外線を 16cm の距離から 1200mJ/cm<sup>2</sup> 照射した。照射時間は 480 秒であった。その後、前記平板を水中で 30 分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

#### 【0069】

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液 (1×TE 緩衝液) も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

#### 【0070】

##### 【比較例 5】

実施例 7 記載の  $\lambda$  DNA 溶液 (濃度 1pmol/ul) それぞれを、ステンレス製の平板の所定の位置に、スポッター (Pyxis5500 CARTESIAN 社製) を用いて 3 箇所ずつスポットした。この平板を乾燥機に入れ 42℃で 20 分乾燥した。その後、前記平板を水中で 30 分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

#### 【0071】

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液 (1×TE 緩衝液) も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

#### 【0072】

##### 【実施例 10】 ハイブリダイゼーション及びその検出

実施例 9 及び比較例 5 の  $\lambda$  DNA 固定化平板を 95℃に暖めた水中に 10 分間浸し、4℃に冷やした水中に 5 分間浸した。次いで、 $\lambda$  DNA 固定化平板の核酸を固定化した部分に、実施例 8 に記載の 1pmol ビオチン化  $\lambda$  DNA (C) を含むハイブリダイゼーション溶液 (Arrayit UniHyb (TeleChem International, Inc.) 60ml をのせ、平板を水が浸入しないケース (ハイブリカセット) に入れてそのケースごとウォーターバスに沈め、60℃で 2 時間加熱した。

#### 【0073】

以下、実施例 8 と同様にしてポストハイブリダイゼーション及びハイブリダイ

ゼーションの検出を行った。その結果を表5に示す。

【0074】

【表5】

表5

固定化した核酸		
	λ DNA断片 (A)	λ DNA断片 (B)
実施例 9	◎	×
比較例 5	×	×

【0075】

表5の結果から明らかなように、ハイブリダイゼーションシグナルが特異的かつ明瞭に現れたことから、実施例9のλ DNA断片固定化平板はλ DNA断片が確実に平板上に固定化されていることがわかる。一方、比較例5のλ DNA断片固定化平板には、シグナルはまったく現れなかった。さらに、実施例9のλ DNA断片固定化平板及び比較例5のλ DNA断片固定化平板のコントロールの位置（核酸を含まない溶液をスポットした箇所）にもシグナルはまったく現れなかった。

【0076】

#### 【実施例11】核酸の平板への固定化

市販品のシリコンウェーハ（三菱住友シリコン株式会社製）の所定の位置に、実施例7に記載のλ DNA溶液それぞれを、スポッター（Pyxis5500 CARTESIAN社製）を用いて3箇所ずつスポットした。スポットの大きさは直径約0.3mmであった。このシリコンウェーハを乾燥機に入れ、42℃で20分乾燥した。次にUvstratalinker 2400（STRATAGENE社製）を用い、波長280nmを含む紫外線を16cmの距離から1200mJ/cm<sup>2</sup>照射した。照射時間は480秒であった。その後、前記シリコンウェーハを水中で30分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

【0077】

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液 (1×TE緩衝液) も同様にシリコンウェーハにスポットし、固定化の操作を行った。

【0078】

【比較例 6】

実施例 7 記載の  $\lambda$  DNA 溶液 (濃度 1 pmol/ul) それぞれを、シリコンウェーハの所定の位置に、スポットター (Pyxis5500 CARTESIAN 社製) を用いて 3 箇所ずつスポットした。この平板を乾燥機に入れ 42℃ で 20 分乾燥した。その後、前記シリコンウェーハを水中で 30 分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

【実施例 12】 ハイブリダイゼーション及びその検出

実施例 11 及び比較例 6 の  $\lambda$  DNA 固定化シリコンウェーハを 95℃ に暖めた水中に 10 分間浸し、4℃ に冷やした水中に 5 分間浸した。次いで、 $\lambda$  DNA 固定化シリコンウェーハの核酸を固定化した部分に、実施例 8 に記載の 1 pmol ビオチン化  $\lambda$  DNA (C) を含むハイブリダイゼーション溶液 (Arrayit UniHyb (TeleChem International, Inc.) 60ml をのせ、シリコンウェーハを水が浸入しないケース (ハイブリカセット) に入れてそのケースごとウォーターバスに沈め、60℃ で 2 時間加熱した。

【0079】

以下、実施例 8 と同様にしてポストハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの検出を行った。その結果を表 6 に示す。

【0080】

【表 6】

表 6

固定化した核酸		
	$\lambda$ DNA 断片 (A)	$\lambda$ DNA 断片 (B)
実施例 11	◎	×
比較例 6	×	×



## 【0081】

表6の結果から明らかなように、ハイブリダイゼーションシグナルが特異的かつ明瞭に現れたことから、実施例11の $\lambda$ DNA断片固定化シリコンウェーハは $\lambda$ DNA断片が確実にシリコンウェーハ上に固定化されていることがわかる。一方、比較例6の $\lambda$ DNA断片固定化シリコンウェーハには、シグナルはまったく現れなかった。さらに、実施例11の $\lambda$ DNA断片固定化シリコンウェーハ及び比較例6の $\lambda$ DNA断片固定化シリコンウェーハのコントロールの位置（核酸を含まない溶液をスポットした箇所）にもシグナルはまったく現れなかった。

## 【0082】

## 【発明の効果】

本発明の方法により、生体分子、例えば核酸、特に鎖長の短い核酸を、金属製担体に簡便、かつ、効率よく固定することができる。また、担体表面のコーティングが不要であるため、金属製の電極等に直接生体分子を固定化することができる。

## 【0083】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Nisshinbo Industries, Inc.

<120> 生体分子の金属担体への固定法

<130> P-B0369

<140>

<141> 2002-11-25

<160> 8

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<221> misc\_feature

<222> ()..()

<223> Description of Artificial Sequence: capture  
oligonucleotide

<400> 1

aaatgggtac tgtgcctgtt a

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<221> misc\_feature

<222> ()..()

<223> Description of Artificial Sequence: capture  
oligonucleotide

<400> 2

atgactaccg gcgcgcacgat g

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<221> misc\_feature

<222> ()..()

<223> Description of Artificial Sequence: probe DNA

<400> 3

tcgcccgcctg tttttgatga ggcggatttt ccggcagttg ccgtttatct caccggcgct 60  
gaatacacgg gcgaagagct ggacagcgat acctggcagg cggagctgca tatcgaagtt 120  
ttcctgcctg ctcaggtgcc ggattcagag ctggatgcgt ggatggagtc ccggatttat 180  
ccggtgatga gcgatatccc ggcaactgtca gatttgatca ccagtatggt ggccagcggc 240  
tatgactacc gcgcgcacga tg 262

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<221> misc\_feature

<222> ()..()

<223> Description of Artificial Sequence: capture  
oligonucleotide

&lt;400&gt; 4

tttttttttt aaatgggtac tgtgcctggt a

31

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial/Unknown

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; ()..()

<223> Description of Artificial Sequence: capture  
oligonucleotide

&lt;400&gt; 5

tttttttttt atgactaccg gcgcgacgat g

31

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial/Unknown

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; ()..()

<223> Description of Artificial Sequence: capture  
oligonucleotide

&lt;400&gt; 6

tttttttttt atgactacca gcgcgacgat g

31

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial/Unknown

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; ()..()

<223> Description of Artificial Sequence: capture  
oligonucleotide

&lt;400&gt; 7

tcgccccgct gtttttgatg a

21

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial/Unknown

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; ()..()

<223> Description of Artificial Sequence: capture  
oligonucleotide

&lt;400&gt; 8

catcgtcgcg ccggtagtca t

21

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例で作製したオリゴヌクレオチド固定化平板を用いたハイブリダイゼーションの結果を示す図（写真）。

点線は、実施例1及び比較例1でオリゴヌクレオチドを固定化した領域、及びコントロールである1×TE緩衝液をスポットした領域を示す。

【書類名】

図面

【図 1】

実施例1

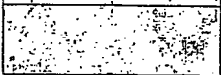
配列番号1



配列番号2



コントロール



比較例1

配列番号1



配列番号2



コントロール



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 生体分子、例えば核酸、特に短鎖長の核酸を金属担体に、簡便、かつ、効率よく固定する方法を提供する。

【解決手段】 核酸の溶液を、周期律表第 2 周期～第 7 周期の I、II、III、IV、V、VI、VII 族および遷移元素から選ばれる金属、又は同金属を含む合金等からなる金属担体上にスポットし、同溶液を乾燥させ、担体に波長 280 nm の成分を含む紫外線を好ましくは  $100 \text{ mJ} / \text{cm}^2$  以上照射することにより、前記担体に核酸を固定する。

【選択図】 図 1



出願 2002-340464

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000004374]

1. 変更年月日

1993年 3月30日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区日本橋人形町2丁目31番11号

氏 名

日清紡績株式会社